第31卷 第4期 昆 虫 学 报 Vol.31, No.4
1988年11月 ACTA ENTOMOLOGICA SINICA Nov., 1988

灭幼脲引起两种幼虫表皮组织病变的显微观察

任久长 马 燕 张宗炳

（北京大学生物系，北京）

摘要 本文研究了灭幼脲引起黄粉蝍(*Tenebrio molitor*)和粘虫 (*Mythimna separata*) 幼虫的中毒征象和组织学病变。低剂量能引起幼虫蜕皮障碍，但看不到明显的组织学病变。高剂量处理，不仅引起了严重的中毒征象，而且伴有明显的组织学病变：内表皮生长停滞，真皮细胞排列异常，在内表皮和真皮细胞之间出现附加层和球状颗粒。对这些现象进行了较细致的讨论。

关键词 黄粉蝍 粘虫 灭幼脲 组织病变 表皮

灭幼脲 (Diflubenzuron) 是一种高效低毒并有一定选择性的新型杀虫药剂，在国内外均已生产使用。灭幼脲的毒理机制有许多学说：1. 影响蜕皮激素及保幼激素 (Yu & Terriere, 1975、1977; Lung, 1980)。2. 影响 DNA 合成 (Mitlin 等,1977; Soltani 等, 1984)。3. 灭幼脲形成一个代谢物，代谢物激活了几丁质酶(Cohen & Caside,1980a、1980b)。4. 几丁质合成酶是一个酶原，灭幼脲抑制了它的活化过程，使其不能成为有活性的几丁质合成酶 (Leighton 等, 1981; Marks 等, 1982; Turnbull & Howells, 1983)。5. 灭幼脲影响了几丁质合成中的一个调节机制(Cohen & Casida, 1982a、1982b)。6. 灭幼脲直接抑制几丁质合成酶 (Mitsui 等,1981; Post & Vincent, 1974; Sowa & Marks, 1975)。目前看来，一般同意最后一个学说，而其他机制为其副作用。

专门报道灭幼脲引起昆虫形态方面(主要为表皮)改变的文献还不多。Mulder(1973)、Ker (1977、1978) 及 Lim (1982) 分别报道了灭幼脲引起菜青虫、飞蝗、短翅稻蝗表皮生长中的组织病变，发现有一些不正常的内表皮出现。本文以鞘翅目拟步蝍科的黄粉蝍 (*Tenebrio molitor*) 及鳞翅目夜蛾科的粘虫 (*Mythimna separata*) 幼虫为材料，观察灭幼脲引起表皮的病理改变，试图对灭幼脲的毒理机制有所阐明。

材 料 与 方 法

一、材料

黄粉蝍幼虫，取自北京动物园。喂以麦麸和菜叶，在 25℃ 恒温室中饲养多代。

粘虫于 1984 月 6 年中旬采自北京海淀东升公社麦田的二代粘虫幼虫。

灭幼脲三号，江苏金坛昆虫激素研究所提供。

二、方法

本文于 1986 年 5 月收到。

用丙酮作溶剂，把一定量的灭幼脲溶解后与定量的麦麸混合均匀，待丙酮挥发后即配制成含有灭幼脲的麸皮饲料。实验中以 200ppm 的灭幼脲麸皮作饲料，饲喂 50 头刚蜕皮身体仍为白色的黄粉岬幼虫，观察中毒现象。

取 20 头身体仍为白色刚蜕皮的黄粉岬幼虫（体重约 100mg）和 10 头刚完成第四次蜕皮进入五龄的粘虫幼虫，用微量加样器给每头幼虫背面滴加 10μl 灭幼脲丙酮液(20℃时，灭幼脲在丙酮液中浓度为 6.5μg/μl)。待丙酮挥发后，放回幼虫并喂以正常食物。一定天数后取材，包氏固定液（Bouin's fixative）固定，石蜡切片，马氏三色法（Mallory triple stain）染色。用显微测微尺测量腹板两侧靠近节间膜处的内表皮厚度。在光学显微镜下观察组织学变化。

为了鉴定附加层成份，分别用猪胰蛋白酶和唾液淀粉酶在 37℃ 下温育 30 分钟，或用 KOH(15%) 在 80℃ 下处理 15 分钟，再进行马氏三色或高碘酸 Schiff 试剂染色，观察组织化学变化。

结　　果

一、灭幼脲引起黄粉岬幼虫的中毒征象

用 100—200ppm 的灭幼脲麦麸饲喂黄粉岬幼虫一至二天，一般不引起任何形态学变化，幼虫依然蜕皮、化蛹、羽化和产卵。如果连续饲喂 200ppm 的饵料或一次性高剂量点滴灭幼脲丙酮液（65μg/头)，则引起幼虫行动迟缓和龄期延长 3—5 天。在蜕皮期到来时，幼虫呈现明显蜕皮障碍。最常见的现象是幼虫身体变短，肿胀、体色逐渐变黑。有的幼虫蜕裂线尚未裂开就已经死亡；有的蜕裂线裂开，露出新的头和胸的背面，但口器、胸足和腹部不能蜕出，整个表皮干裂，身体动辄流液而死亡。若是末龄幼虫，则不能化蛹或形成畸蛹，身体前端为蛹形，后部为幼虫形。个别外观上正常的蛹，也不能正常羽化，其头部为成虫样，胸部无翅或残翅，腹部仍为蛹形。

二、黄粉岬幼虫表皮组织学病变

虽然连续喂以 200ppm，甚至 2000ppm 的灭幼脲饵料而引起黄粉岬幼虫蜕皮障碍，造成死亡，但在组织切片观察中尚未见到明显的组织学病变。若在刚蜕皮的幼虫背部滴加灭幼脲溶液后，数天就可见到明显的组织学病变。其主要表现有三：

1. 内表皮减薄

刚蜕皮的幼虫呈白色，24 小时内鞣化变硬呈黄褐色，形成幼虫新的上表皮和外表皮。经过马氏三色染色，上表皮不着色，仍为原来的琥珀色，外表皮呈红色。呈兰色的内表皮是在蜕皮间期中形成的，其厚度随蜕皮后日龄的增加而增加（图版 I：1)。处理组的幼虫，其内表皮厚度明显比正常组薄(图版 I：2)。用显微测微尺测量正常与处理组的内表皮厚度，处理后黄粉岬幼虫内表皮只有正常的一半左右。(7μ:14μ)

2. 附加层的出现

正常内表皮是通过表皮下层与真皮细胞紧密相连的。在处理组中，有些部位的内表皮与真皮细胞分离，二者之间的空间在切片上呈网絮状的紫色附加层，有的部位布满紫色微粒和稀疏的红色球形颗粒(图版 I：2)。在头部、胸部和足的切片中也见到同样的附加层。在背腹板两侧的节间膜处，附加层最明显，其厚度可以是整个体壁的数倍(图版 II：

5)。在偏光显微镜下,内表皮具有清晰的板层结构,但附加层内不具有板层结构。

3.真皮细胞排列分布异常

正常的单层上皮细胞紧密排列在内表皮之下，非常规则整齐；处理组真皮细胞与表皮分离,位于附加层之下,细胞层发生堆集、折叠(图版 II：6、7)。这种异常排列与附加层出现部位相吻合,都是在节间膜处最明显。

三、粘虫表皮的组织学病变

正常组粘虫幼虫外表皮较薄,约为 2.5 μm,而内表皮较厚,约为 15.0 μm。因此用马氏三色染色后,表皮层红色少,主要呈蓝色内表皮。表皮细胞和内表皮紧密相连。用灭幼脲处理后四天的五龄幼虫表皮,其效应主要是嗜蓝色的内表皮分离,二者之间出现结构疏松的附加层,附加层内有许多分散的嗜红色的球状颗粒,鲜艳夺目(图版 I：3)。

尽管粘虫表皮薄而柔软,正常组与处理组表皮都出现许多纵行皱褶,但也可以见到真皮细胞层排列紊乱的现象。

四、附加层成份的组织化学鉴定

切片在唾液淀粉酶内温育 30 分钟后,再分别进行 Schiff 试剂染色和马氏三色染色，切片显示附加层内的球状颗粒与对照组没有区别。PAS 反应染色呈紫色颗粒,马氏三色染色呈红色颗粒,都与外表皮染色一致。从附加层内球状颗粒抗唾液淀粉酶消化的能力说明,这些颗粒不是多糖,而是一种蛋白质。

切片在猪胰蛋白酶液内温育 30 分钟,进行马氏三色染色，在切片上可以明显地观察到表皮细胞层已被消化，丧失其原有结构，只在个别部位残留隐约可见的轮廓(图版 I：4)，内外表皮仍然存在,外表皮呈红色,内表皮呈蓝色，附加层内的网状结构亦被消化而着色减弱,但嗜红色球状颗粒依然存在,与未经胰蛋白酶处理的对照组染色相同，呈鲜红色。这一结果表明,附加层内网状结构是由可被猪胰蛋白酶消化的粘蛋白构成。而附加层内的球状颗粒则与外表皮、内表皮一样,不能被胰蛋白酶所水解。附加层内球状颗粒与外表皮在抗胰蛋白酶消化和染色两方面的一致性,反映出二者化学成份相同,都是高度鞣化的几丁质蛋白复合物。

在 80℃15%KOH 溶液中处理 15 分钟,进行马氏三色染色的切片上，可以见到与猪胰蛋白酶处理后相同的结果,表皮细胞层被消化，只留红色外表皮、蓝色内表皮以及靠近蓝色内表皮附近的呈红色的球状颗粒(图版 II：8)。

讨 论

一、中毒征象

从结果来看,主要的中毒征象是蜕皮障碍。从组织切片中我们已看到内表皮变薄,被一层结构疏松的物质所代替。这使肌肉不能牢固地附着在体壁上，加上表皮本身机械强度降低,导致蜕皮失败,尤其是上颚和足等肌肉发达的部位，蜕皮更不易。幼虫和蛹体色加深变黑，是灭幼脲引起酚氧化酶活性增加，促进表皮黑化的缘故 (Ishaaya & Casida, 1974)。

二、灭幼脲效应出现的部位与时间

灭幼脲对组织的效应大小与处理剂量和部位关系较大。低剂量（100ppm 取食 1—2

天)不引起组织学病变，也不引起蜕皮障碍。高剂量 (65 μg/头)一次处理就引起组织学病变，内表皮减薄和附加层出现。尤其是背板和腹板之间的节间膜处，附加层最厚，表皮细胞移位最明显，但背板和腹板的中间部位几乎不出现附加层，真皮细胞和内表皮紧密相关。

我们从粘虫和黄粉岬幼虫所得到的这一结果与其他学者研究蝗虫，菜青虫和蜡螟所得的结果是一致的。他们也都报道了不同部位的表皮几丁质所受影响的不同。有的部位几乎不受影响，原因至今不明，只是推测与不同生理状态或不同的几丁质合成酶有关。

低剂量的短期处理可能象在蝗虫中那样，灭幼脲的存在抑制了真皮细胞合成几丁质，但灭幼脲很快被代谢后，真皮细胞又恢复了合成几丁质的能力，因而不影响蜕皮。长期连续服用灭幼脲，造成几丁质含量过低，导致蜕皮失败。而一次高剂量处理使真皮细胞失去恢复合成几丁质的能力，引起一系列几丁质缺乏征象。

三、附加层

灭幼脲引起附加层的出现，始见于 Gijswijt (1973) 对菜青虫的研究。他认为，内表皮和表皮细胞之间的联结已经除去，二者之间的空间被带有分散的嗜红色和桔黄色球状颗粒的液体所充满。他猜测该液体仍是表皮蛋白或是不稳定的分泌物。

我们在黄粉岬和粘虫幼虫表皮中都看到了这一现象，而且还发现在某些部位，如节间膜附近，附加层十分深厚，数倍于正常体壁。我们用唾液淀粉酶、猪胰蛋白酶和 KOH 液处理切片再染色的方法，进行细胞化学鉴定，证明附加层内的网状结构主要是可被猪胰蛋白酶水解的粘蛋白组成的。其嗜红色球状颗粒是由不被猪胰蛋白酶和 KOH 消化，类似于外表皮的高度鞣化复合几丁蛋白组成。

Clarke (1976) 发现，在节间膜处几丁质和蛋白质之间维持一定的比例，几丁质的量决定着交联蛋白质的量。由于灭幼脲抑制了几丁质合成酶，而没有抑制蛋白质合成酶，几丁质合成减少了，与几丁质交联的蛋白质相应也减少。一部分多余的没有交联的蛋白质分子成为游离的分子而积累在内表皮和表皮细胞之间，形成了附加层。几丁质减少的另一种表现是几丁质链变短。这一部分短链几丁质分子，没有进入表皮板层结构中，而与附加层内游离的蛋白质分子直接结合形成几丁蛋白，并在酶的作用下进一步鞣化成类似于外表皮的复合几丁蛋白。

四、真皮细胞排列分布异常

以往的文献中，对真皮细胞的形态变化描述较少。Ker (1978) 提到有的细胞脱离新分泌的表皮。我们观察到真皮细胞排列上发生很大改变，但没有见到活跃的分裂相，不属于真皮细胞的不规则增生。 由于真皮细胞层的弯曲折迭总是和加厚的附加层同时出现，很可能是附加层内积液过多所造成的位置效应。

总之，灭幼脲作为几丁质合成酶的抑制剂，抑制真皮细胞合成几丁质，造成内表皮生长阻滞为一级效应，而出现附加层和真皮细胞排列紊乱则是内表皮损伤后的次级效应。当然，最终的效应是导致蜕皮失败。引起幼虫死亡。

参　考　文　献

张宗炳　1980　灭幼脲及其作用机制。《昆虫毒理学新进展》，第 39—72 页。北京大学出版社。

Ascher, K. RS. & N. E. Nemny 1976 Toxicity of the chitin synthesis inhibitor, diflubenzuron and its dichioro-analogue, to *Spodoptera littoralis* larvae. *Pestic. Sci.* 7: 1.

Cohen, E. & J. E. Casida 1980a Properties of *Tribolium* gut chitin synthetase. *Pestic. Biochem. Physiol.* 13: 121.

Cohen, E. & J. E. Casida 1980b Inhibition of *Tribolium gut* chitin synthetase. *Pestic. Biochem. Physiol.* 13: 129.

Cohen, E. & J. E. Casida 1982a Properties and inhibition of insect intergumental chitin synthetase. *Pestic. Biochem. Physiol.* 17: 301.

Duel, D. H. et al. 1978 Inhibition of chitin synthesis by two 1-(2,6-disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 8: 98.

Gijswijt, M. J. et al. 1979 Inhibition of chitin synthesis by bezoyl-phenylurea insecticides: similarity in action in *Pieris brassicae* (L.) with polyxin D. *Pestic. Sci.* 9: 259.

Grosscurt, A. C. 1978 Diflubenzuron: some aspects of its ovicidal and larvicidal mode of action and an evaluation of its practical possibilities. *Pestic. Sci.* 9: 373.

Ker, R. F. 1978 The effects of diflubenzuron on the growth of insect cuticle. *Pestic. Sci.* 9: 259.

Leighton, T. et. al. 1981 Pesticides: insecticides and fungicides are chitin synthetase inhibition. *Science* 213: 905.

Lung, G. 1980 Untersuchungen zur wirkung von diflubenzuron auf die larven von *Athalia rosae. Z, Pflanzen Krankh Pflanzensh.* 87: 13.

Marks, E. P. et. al. 1982 Modes of action of chitin synthetase inhibitor. in "Insecticide: mode of action" p. 281.

Mitlin, N. et. al. 1977 Inhibition of DNA synthesis in boll weevil sterilized by dimilin. *Pestic. Biochem. Physiol.* 7: 559.

Mitsui, T. et. al. 1981 Inhibition of chitin synthesis by diflubenzuron in *Mamestra brassicae. Pestic. Sci.* 6: 155.

Post, L. C. et. al. 1974 1-(2,6-disubstituted benzoyl)-3-phenylurea insecticides: inhibition of chitin synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 4. 473.

Soltani, N. et. al. 1984 Effects of diflubenzuron on the pupal-adult development, cuticle secretion, epidermal cell density and DNA synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* 21: 256.

Suat-Jien Liu & Soo-Seong Lee 1982 The toxicity of diflubenzuron to *Oxya japonica* (Willemse) and its effect on moulting. *Pestic. Sci.* 13: 537.

Sundaramurthy, V. T. & K. Santhanakrishnan 1979 Morphogenetic effects of diflubenzuron, an inhibitor of chitin deposition, on the coconut black-headed caterpillar (*Nephantis serinopa* Myer.). *Pestic. Sci.* 10: 147.

Turn, I. F. & A. J. Howells 1983 Integumental chitin synthetase activity in the free extracts of larvae of the Australian sheep blowfly and two other species of Diptera. *Aust. J. Biol. Sc.* 36: 251.

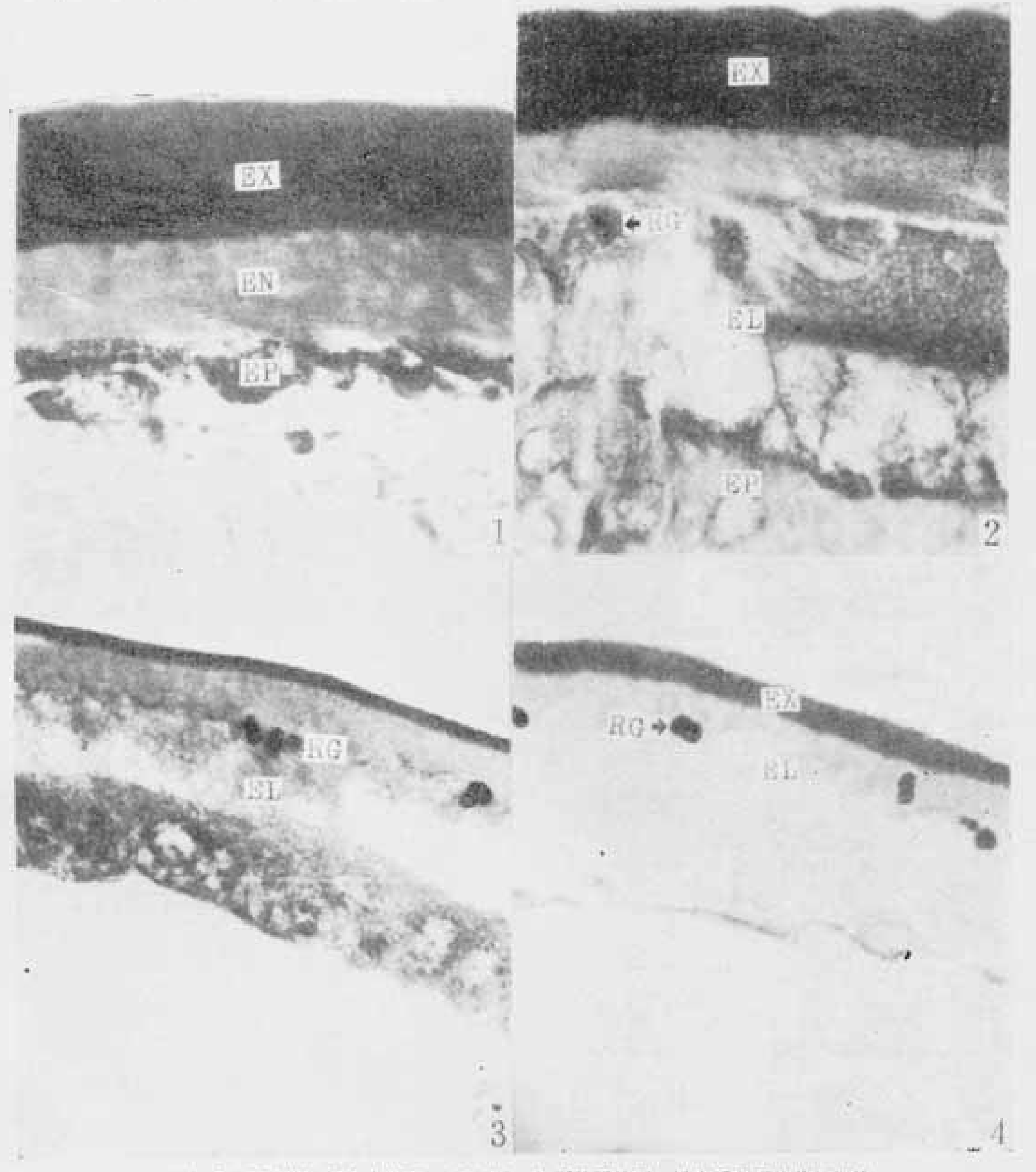
MICROSCOPICAL OBSERVATION ON THE HISTOPATHOLOGICAL CHANGES OF CUTICLE INDUCED BY DIFLUBENZURON IN TWO INSECT LARVAE

J. C. Ren Y. Ma J. T. Chang

(*Department of Biology, Peking University, Beijing*)

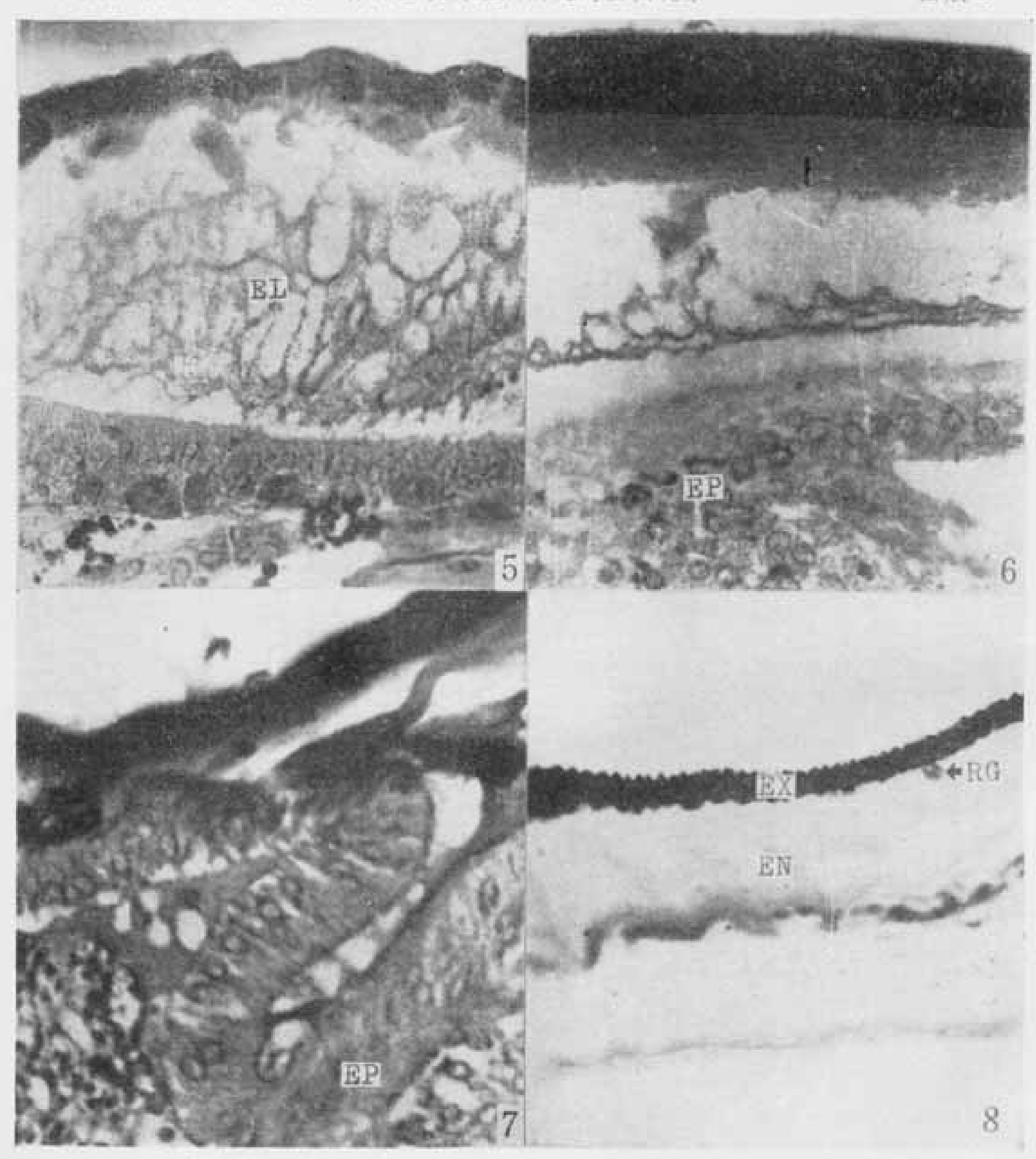
The symptoms and histological changes of diflubenzuron poisoning in *Tenebrio molitor* and *Mythimna separata* were studied. Histological evidence reveals that ecdysial failure and mortality were invariably related to the blocking of endocuticular formation and, in cases of higher dosages, also to development of extra layer and globular bodies between endocuticle and epidermis, and abnormal arrangement of epidermal cells. The significance of these histological changes is discussed.

Key words *Tenebrio molitor*——*Mythimna separata*——diflubenzuron——histopathology——cuticle



1.蜕皮后5天的黄粉甲幼虫体壁。×1,000　2.灭幼脲处理，蜕皮后7天的黄粉甲幼虫体壁。×1,000　3.灭幼脲处理，五龄4天的粘虫体壁。×1,000　4.灭幼脲处理，粘虫幼虫体壁，胰蛋白酶处理，马氏三色染色。示附加层内嗜红颗粒与外表皮染色一致，表皮细胞被消化，界限不清。×1,000

EX 外表皮，EN 内表皮，EP 表皮细胞，EL 附加层，RG 嗜红颗粒



5.灭幼脲处理的黄粉鲆幼虫体壁，示数倍于体壁的附加层。×500　6.灭幼脲处理的黄桥鲆幼虫体壁，示表皮细胞的堆集。×1,000　7.灭幼脲处理的黄粉鲆幼虫体壁，示表皮细胞层内陷折迭。×1,000　8.灭幼脲处理后粘虫幼虫体壁。KOH 处理、马氏三色染色。示真皮细胞层被消化，球状颗粒与表皮层共存。×1,000